

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ
НАДФ-МАЛИК-ФЕРМЕНТА ГРУШ

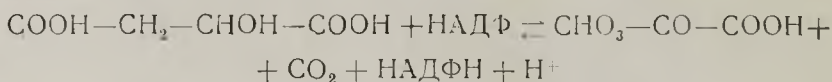
Т. А. МКРТЧЯН, Е. Г. САЛЬКОВА

Рассмотрены некоторые кинетические свойства НАДФ-малик-фермента: зависимость от концентрации субстрата, температуры, pH, молярности буфера. Установлено, что структурные аналоги яблочной кислоты ингибируют фермент. Лимонная, винная, малоновая, щавелевая кислоты не могут служить субстратом для действия этого фермента.

Биохимические процессы при созревании плодов изучены достаточно хорошо [2,15]. Интерес к этому вопросу понятен, так как изучение его способствует разработке оптимальных режимов хранения плодов.

Крупным успехом в изучении биохимии плодов можно считать сформулированные в последние годы представления о ключевых процессах созревания, согласно которым последовательность биохимических процессов в них такова: активация биосинтеза липидов, этилена, РНК и биосинтеза белков, в частности специфического белка—НАДФ-малик-фермента (L-малат-НАДФ-оксидоредуктаза, КФ 1.1.1.40).

Все эти процессы рассматриваются в настоящее время как ключевые. Наше внимание было сосредоточено на изучении НАДФ-малик-фермента, ведущего декарбоксилирование яблочной кислоты до пировиноградной и углекислого газа.



Активность НАДФ-малик-фермента в период созревания яблок и груш резко возрастает [4, 13, 16]. Несмотря на решающую роль его в механизме созревания плодов исследования в этом направлении немногочисленны, к тому же подавляющая часть их проведена на яблоках. Имеются единичные сведения о присутствии этого фермента в винограде [9, 14], вишнях [10—12], манго [6].

Материал и методика. Исследования проводились на трех сортах груш: Лесная красавица, Бере Лигеля и Дзмернук. Груши собраны с Мердзаванской экспериментальной базы Армянского НИИ виноградарства, виноделия и плодоводства и заложены на хранение при трех температурных режимах: 20—22 (комнатное хранение), 5 и 2°.

Выделение активного препарата НАДФ-малик-фермента из груш проводилось по ранее описанному методу [5].

Для концентрирования ферментного белка к 30 мл препарата добавляли 5 г сефадекса g-50, два часа выдерживали при 4°, после чего центрифугировали при 5000 об/мин в течение 5 мин [1]. В надосадочной жидкости определяли активность НАДФ-малик-фермента и содержание белка.

Активность фермента определялась спектрофотометрическим методом при 340 нм в реакционной смеси, состоящей из 1 мл трис-буфера (0,1 М), 0,2 мл MnSO_4 (13 мМ), 0,6 мл яблочной кислоты (15 мМ), 0,8 мл ферментного препарата, 0,2 мл (12 мМ) НАДФ. Объем смеси доводили до 3 мл водой.

За единицу активности принималось изменение оптической плотности реакционной смеси на 0,01 за 1 мин. Результаты выражались в нмолях НАДФН₂ на 1 мг белка, а также на 1 г исходного сырого веса.

Содержание белка определялось по Лоури [1].

Результаты и обсуждение. Определение зависимости активности НАДФ-малик-фермента от концентрации субстрата показало, что при повышении содержания яблочной кислоты от 3 до 9 мкмоль скорость реакции декарбоксилирования его повышается, достигая максимума при 9 мкмоль. Дальнейшее повышение концентрации субстрата до 12 мкмоль не влияет на скорость этой реакции (рис. 1). Пользуясь пред-

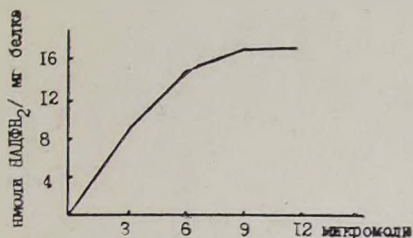


Рис. 1.

Рис. 1. Зависимость активности НАДФ-малик-фермента от концентрации яблочной кислоты.

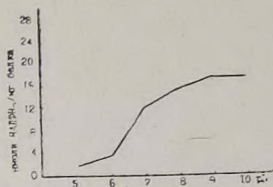


Рис. 2.

Рис. 2. Зависимость активности НАДФ-малик-фермента от pH реакционной среды.

ставленным графиком, мы определили значение константы Михаэлиса (K_m) для НАДФ-малик-фермента груш. В условиях нашего опыта она оказалась равной $5,3 \cdot 10^{-4}$ М. По имеющимся литературным данным, K_m для НАДФ-малик-фермента яблок равна $5,5 \cdot 10^{-4}$ [16], $3,7 \cdot 10^{-4}$ [17], а груш — $4,5 \cdot 10^{-4}$ М [8]. Таким образом, наши данные близки к литературным.

Изучение влияния pH реакционной смеси на активность фермента показало, что наибольшей величины она достигает при щелочной реакции смеси (рис. 2).

Активность фермента в трис-буфере составляла 80% от его активности в фосфатном буфере. При повышении молярности последнего от 0,01 до 0,6 М она возрастала, а дальнейшее повышение до 1 М приводило к ее падению (рис. 3).

НАДФ-малик-фермент является термолабильным ферментом с температурным оптимумом, близким к 20°. Снижение температуры смеси до 2° сильно тормозило его активность, она возрастала при повышении

температуры до 20°. Дальнейшее повышение температуры приводило к постепенному снижению активности. При температуре 80° фермент ин- активировался. Температурный коэффициент Вант-Гоффа для НАДФ- малик-фермента равен 1,6. Данные этого модельного опыта согласуются с результатами изучения влияния различных температур хранения на активность фермента. Ранее нами было показано [5], что активация НАДФ-малик-фермента в ходе созревания и перезревания груш имеет два пика возрастания. Первый пик соответствует фазе созревания, вто- рой—фазе перезревания груш. Понижение температуры хранения груш задерживает наступление периода активации фермента, удлиняет его продолжительность. Наиболее интенсивно этот процесс протекает при температуре хранения 20—22° (рис. 4).

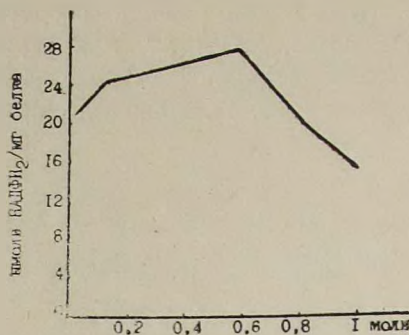


Рис. 3.

Рис. 3. Зависимость активности НАДФ-малик-фермента от молярности фосфатного буфера.

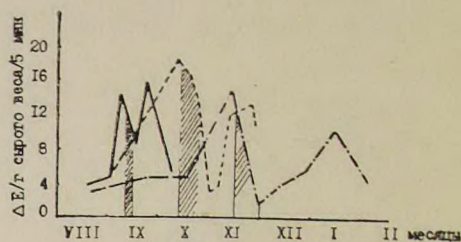


Рис. 4.

Рис. 4. Изменение активности НАДФ-малик-фермента при хранении груш сорта Лесная красавица при разных температурах.

Как известно, в плодах присутствуют структурные аналоги яблоч- ной кислоты. Представляло интерес выяснение их влияния на актив- ность НАДФ-малик-фермента. Нами рассмотрены следующие струк- турные аналоги яблочной кислоты: винная, лимонная, янтарная, мало- новая, щавелевая. Для сравнения были испытаны молочная гликоле- вая (оксимонокрбоновые), муравьиная кислота (монокарбоновая). Данные табл. 1 показывают, что только структурные аналоги яблочной кислоты ингибируют реакцию его декарбоксилирования. Винная кис- лота подавляет активность фермента на 25, малоновая и лимонная—на 50, щавелевая и янтарная—на 100%. Эти кислоты или сами являются промежуточными продуктами цикла Кребса (янтарная и лимонная кис- лоты), или легко могут вступить в цикл (винная, малоновая, щавеле- вая). Сказанное позволяет предположить, что кислоты цикла Кребса ингибируют активность НАДФ-малик-фермента. К такому же выводу пришли французские исследователи [8].

Нас интересовал вопрос, могут ли структурные аналоги яблочной кислоты служить субстратом для НАДФ-малик-фермента груш. С этой целью изучалась способность ферментного препарата восстанавливать

Таблица 1

Влияние различных кислот на активность НАДФ-малик-фермента

Добавленная кислота	Активность фермента, %
Яблочная	100
Муравьиная	100
Гликолевая	100
Молочная	100
Винная	75
Лимонная	50
Малоновая	50
Щавелевая	0
Янтарная	0

Таблица 2

Субстратная специфичность НАДФ-малик-фермента

Добавленная кислота, 15 мМ	Активность фермента	
	нмоль НАДФН ₂ / мин / мг белка	%
Яблочная	18,6	100
Лимонная	2,42	12,5
Винная	2,24	11,6
Малоновая	2,24	11,6
Щавелевая	1,3	6,8

Примечание: За 100% принята активность яблочной кислоты. В кювету вносили 5 мМ яблочной кислоты и 5 мМ исследуемой.

НАДФ в присутствии винной, малоновой, щавелевой, лимонной кислот. Результаты исследований показали, что наиболее слабо НАДФ восстанавливается в присутствии щавелевой кислоты, активность фермента при этом составляет 6,8% от активности фермента при инкубации срезов в яблочной кислоте (табл. 2). Восстанавливающая способность фермента в присутствии лимонной, винной, малоновой кислот составляет лишь 12%.

Таким образом, рассмотренные структурные аналоги яблочной кислоты не могут служить субстратом для НАДФ-малик-фермента груш.

Армянский НИИ виноградарства, виноделия и плодоводства МСХ АрмССР, Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР

Поступило 9.II 1979 г.

ՏԱՆՁԻ ՊՏՈՒՂՆԵՐԻ НАДФ-ՄԱԼԻԿ ՖԵՐՄԵՆՏԻ ՄԻ ՔԱՆԻ ԱՌԱՋՆԱՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

Տ. Ա. ՄԿՐՏՉՅԱՆ, Ե. Գ. ՍԱԿՈՎԱ

Ուսումնասիրվել են НАДФ-մալիկ ֆերմենտի կինետիկ հատկությունները՝ ֆերմենտի ափսիվության կախվածությունը միջավայրի կոնցենտրացիայից, ջերմաստիճանից, pH-ից, բուֆերի մոլյարությունից:

Պարզվել է, որ խնձորաթթվի կառուցվածքային անալոգները՝ գինեթթուն, լիմոնաթթուն, մալոնային թթուն, թրթնշկաթթուն, սաթաթթուն ինհիբացիոն են ֆերմենտին:

Լիմոնաթթուն, գինեթթուն, մալոնային թթուն, քացախաթթուն, թրթնշկաթթուն НАДФ-մալիկ-ֆերմենտի գործողության միջավայր չեն կարող հանդիսանալ:

SOME NADF-MALIC-ENZYME PROPERTIES OF PEARS

T. A. MKRTCHYAN, E. G. SALKOVA

The following kinetic properties of NADF-malic-enzyme have been studied: dependence on substrate concentration, temperature, actual acidity, concentration of buffer. The inhibition of enzyme by structural analogues of malic acid has been established.

Impossibility of citric, tartaric, malonic, oxalic acids to serve as a substrate for NADF-malic-enzyme activity has been shown.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Конетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии. 41, 311, М., 1971.
2. Метлицкий Л. В., Салькова Е. Г., Марселев Г. Прикладная биохимия и микробиология. 13, 3, 340, 1977.
3. Салькова Е. Г. Докт. дисс., М., 1973.
4. Сальникова Е. Г., Звягинцева Ю. В. Сб.: Иммуитет и покой растений. 235, М., 1972.
5. Салькова Е. Г., Мкртчян Т. А. Прикладная биохимия и микробиология, 14, 2, 284, 1978.
6. Baqui Salmz M., Mattoo A. K., Modi V. Phytochemistry, 13, 10, 2049, 1974.
7. Dilley D. R. Plant Physiol., 41, 214, 1965.
8. Drout A., Hartmann C. Phytochemistry, 16, 5, 505, 1977.
9. Goracia P., Buret M., Chambroy Y. C. r. Acad. agr. France., 60, 5, 1193, 1974.
10. Hartmann C. Qual. Plant. Mater. Veg., 20, 221, 1971.
11. Hartmann C. C. r. Acad. sci., 276, 12, 1851, 1973.
12. Hartmann C. Colloq. int. C. N. R. S., 238, 235, 1975.
13. Hartmann C., Lugon M., Valade D. Physiol. veg., 6, 279, 1968.
14. Hawker G. C. Phytochemistry, 8, 1, 19, 1969.
15. Hulme A. C. The biochemistry of fruit and their products, 1, London, 1970.
16. Hulme A. C., Gones G. D., Woollorton L. S. C. Proc. Roy. Soc. Biol. Sc., 158, 514, 1963.